

201225017A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の
開発と予防診断法に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成25 (2013) 年 3月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の
開発と予防診断法に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成25(2013)年 3月

目 次

I. 総括研究報告書

培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の開発と
予防診断法に関する研究

鈴木 哲朗 1

II. 分担研究報告書

ノロウイルスの複製機構

片山 和彦 13

標準的ウイルス分離法を用いたノロウイルス分離の試み

田中 智之 19

次世代シーケンサーを用いたノロウイルスの混合感染の解析

本村 和嗣 23

マウスノロウイルスの培養細胞での増殖馴化に伴う遺伝子配列変化の解析、
および新規ヒトポリオーマウイルスの中和抗体検定法の開発

中西 章 27

ノトバイオート豚を利用したB群ロタウイルス感染モデルの確立と病態解析

恒光 裕 33

E型肝炎ウイルスレプリコンの構築およびレプリコン包埋VLP作成の検討

石井 孝司 37

ラットE型肝炎ウイルス様粒子の作製および粒子形成に必要な領域の同定

李 天成 45

子宮頸癌の治療薬を目指した特殊ペプチドによるE6AP阻害剤の開発

勝二 郁夫 49

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別冊

I. 総括研究報告書

培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の開発と予防診断法に関する研究

研究代表者 鈴木 哲朗 浜松医科大学医学部 教授

研究要旨 ノロウイルス：マウスノロウイルス（MuNoV）、ネコカリシウイルスのリバースジェネティクスシステムを構築、MuNoV はヒト細胞株でも感染性粒子作出に成功した。MuNoV の増殖馴化に関与する遺伝子変異を同定した。食中毒事例等由来の新鮮糞便検体を用いて各種培養細胞株へのHuNoV 感染感受性を解析した。次世代シーケンサーを用いて、HuNoV の混合感染の実態を明らかにした。

ロタウイルス：ノトバイオトブタ感染系による B 型ロタウイルス病態モデルにおいて、遺伝学的、抗原性の異なるウイルス株間での病原性の違いを見出した。

ポリオーマウイルス：KIPyV, WUPyV の pseudovirion を作製し中和抗体測定系を樹立した。JCV、BKV、MCPyV と糖脂質糖鎖との相互作用を詳細に解析、また MCV pseudovirion を用いて、糖脂質糖鎖依存的な感染機構を明らかにした。

E 型肝炎ウイルス：各種レポーターを有するレプリコンの構築に成功、レプリコンをウイルス様粒子に包埋させる方法を樹立した。ラット E 型肝炎ウイルスのウイルス様粒子作製に成功、粒子形成に必要なアミノ酸領域を同定した。

パピローマウイルス：子宮頸癌特異的治療薬の開発を目指し、E6/E6AP と結合し、p53 のユビキチン化を阻害する環状 N-メチルペプチドを取得した。

分担研究者

片山 和彦 国立感染症研究所 室長
田中 智之 堺市衛生研究所 所長
本村 和嗣 国立精神・神経研究センター 室長
恒光 裕 動物衛生研究所 研究チーム長
李 天成 国立感染症研究所 主任研究官
石井 孝司 国立感染症研究所 室長
中西 章 国立長寿医療研究センター 室長
勝二 郁夫 神戸大学医学研究科 准教授

A. 研究目的

培養細胞での感染増殖系が確立されていないためにウイルス学的研究に制約があり、その感染症対策が十分でないウイルスについて、1)

ウイルス様粒子 (VLP) を利用した抗原抗体診断法の開発と血清疫学解析、2) 実験モデルの開発とウイルス生活環の解析、3) 宿主免疫応答の解析とワクチン開発の基盤研究を包括的に行う。

B. 研究方法

1. ノロウイルス

1-1. マウスノロウイルス (MuNoV)、ネコカリシウイルス (FCV) のリバースジェネティクスシステム (RGS) :

MuNoV は、遠矢幸伸准教授（東京大学大学院農学生命研究科）により分離された MuNoV-S7 株を用いた。MuNoV S7 株の各タンパク質を大腸菌で発現させ、精製後にウサギとモルモット

トに免疫して抗 MuNoV 血清を作製した (α Nterm, α NTPase, α VPg, α RdRp, α VP1, α VP2)。

HuNoV pKS-U201F (RGS に用いるプラスミドコンストラクト) を骨格として、HuNoV U201 genome 部分を MuNoV genome cDNA, FCV genome cDNA に InFusion cloning system を用いて置き換え、pKS-MuNoVF, pKS-FCV-F を構築した。それぞれの感受性細胞 (MuNoV は RAW264.7 細胞、FCV は CRFK 細胞) を 6 well ディッシュに 70%コンフルエントになるように培養し、4ug の pKS-MuNoVF または pKS-FCV-F をトランスフェクションした。上清を回収し、TCID50 を測定することで、上清に含まれる感染性ウイルス粒子量を定量した。

1-2. MuNoV 感染モデル

MuNoV S7 株を RAW264.7 細胞で 2 代、3 代、13 代継代したウイルス材料から RNA 抽出、cDNA 合成に MuNoV 遺伝子配列を決定した。この cDNA を pKS53R MNV S7 (MuNoV S7 野生型全長含) の一部と交換した。得られたプラスミドより作製した試験管内転写物の 5' 末端に ScriptCap system (Epicentre) により Cap 構造を付加した。Lipofectamin2000 (Invitrogen) あるいは TransIT mRNA transfection kit (Takara) により 293T 細胞にトランスフェクションして組換えウイルスを作製した。トランスフェクション後 24 時間にその培養上清を採取して RAW264.7 細胞に感染させた。

1-3. 細胞培養によるノロウイルス分離：

HuNoV 流行事例から得られた新鮮な糞便材料を用いた。10%乳剤化後、3,000rpm、10 分間および 8,500rpm、30 分間遠心した後、上清を 30% ショ糖液に重層し、36,000rpm、2 時間超遠心した。沈渣を PBS (-) に suspend し、 $0.80\mu + 0.45\mu$ filter にてろ過した。これらのウイルス検体にアセチルトリプシンまたはペプシンを種々の濃度で添加、インキュベートした。感染実験には、ヒト膵臓がん由来 PANC-1 細胞、ヒト大腸がん由来 CaCo-2 細胞及びヒト結腸がん由来 Coa-1 細胞を用いた。

1-4. HuNoV 混合感染の解析：

2010 年 3 月-2012 年 3 月までの 2 年間で 5 回、HuNoV 感染による胃腸炎を発症した成人女性を対象とした。糞便中の HuNoV の Capsid 遺伝子 shell 領域の 5' 末端領域の配列を次世代シーケンサー FLX 454 (Roche) により網羅的に解析した。

2. ロタウイルス

ノトパイオートブタを用いた B 群ロタウイルス (RoV) 感染実験：

RoV の主要構造蛋白質である VP6 に関して、遺伝学および抗原学的に相違が認められたブタ B 群 RoV 2 株 (93-I5 および 107-G16 株) をそれぞれノトパイオート豚 (3 日齢) に同量経口接種した。接種 1 日後から経時的に腸管および主要臓器を採取し、ウイルス学的検査および病理組織学的検査を実施した。特に、病理組織学的検査では、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて両株間における病原性の相違を比較解析するとともに、他のロタウイルスとの病理組織学的な相違についても比較解析した。

3. ポリオーマウイルス

psudovirion によるポリオーマウイルス感染モデル：

研究分担者中西が開発した psudovirion system により、各ポリオーマウイルス (JCV, BKV, MCPyV, WUPyV, KIPyV) のカプシドをもつ psudovirion を以下の方法で作製した。3 種類のプラスミド：(1) 各ウイルスの VP1 遺伝子を有する pCAG ベクター、(2) SV40 T 抗原を発現する pCI Ts、(3) SV40 origin をもち分泌型 Gaussia ルシフェラーゼ (Gluc) を発現する pCMV Gluc2、を 293T 細胞にトランスフェクションし、64-68 時間後に細胞を回収した。細胞抽出液を Nuclease 処理し、27-39% Optiprep の連続密度勾配遠心、分画し、SV40 origin をターゲットとした PCR により pCMV Gluc2 を多く含む分画を同定し、精製することにより各 psudovirion を回収した。

4. E型肝炎ウイルス

4-1. E型肝炎ウイルス (HEV) レプリコンの構築:

HEVの感染性クローン83-2の構造蛋白領域をレポーター遺伝子で置換したcDNAを作製し、本クローンの上流に挿入したT7 promoterを用いてRNAを合成した。本RNAをヒト肝癌由来細胞PLC/PRF/5細胞にエレクトロポレーションにより導入し、レポーター遺伝子が機能するかどうか調べた。また、本細胞で構造蛋白を発現させ、さらにレプリコンRNAを導入することで、構造蛋白中にレプリコンRNAが包埋された形で粒子構造が形成されるかどうかを調べた。

4-2. ラットHEVの粒子形成解析

ラットHEV (GU345042)の構造蛋白をコードするORF2 cDNAを合成した。NあるいはC末端領域、さらに両末端を部分欠失したラットHEV構造蛋白遺伝子をPCRで増幅して組換えバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞Tn5およびSf9で発現した。発現蛋白はSDS-PAGE、ウェスタンブロット法等で、粒子形成の有無およびその形状は電子顕微鏡で観察した。

5. ヒトパピローマウイルス

フレキシザイムを用いた遺伝暗号リプログラミング法と、mRNA鋳型依存的に天然物様特殊ペプチドライブラリーを合成する技術とその網羅的探索技術RaPID (the random non-standard peptides integrated discovery) systemでE6APのHECTドメインに結合する特殊ペプチド(環状N-メチルペプチド)を作製した(東京大学理学部、菅教授との共同研究)。得られた特殊ペプチドのE6AP阻害活性をPrx1およびp53を基質にしてin vitro ユビキチン化アッセイで評価した。ユビキチン経路の構成蛋白を得るために、His₆-E1, MEF-E6APを発現する組換えバキュロウイルスを昆虫細胞Hi5細胞に感染させ、各組換え蛋白を発現した。細胞からNi-NTAまたはFLAG-beadsで各蛋白をアフィニティ精製した。His₆-UbcH7を大腸菌BL21 (DE3)で、GST-11E6, GST-16E6を大腸菌DH5αで発現し、Ni-NTA また

は精製した。これらの組換え蛋白を用い、HPV E6蛋白のin vitro ユビキチン化を解析した。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は、適切な申請を行い承認を受けた。ヒト由来臨床材料の使用にあたっては、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成13年3月29日付12文科振第266号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを行い、承諾を得た上で実施した。提供試料、個人情報厳格に管理保存されている。

C. 研究結果

1. ノロウイルス

1-1. MuNoV、FCVのRGSを利用した増殖機構の解析:

HuNoVと近縁のMuNoVのタンパク質、virus RNAの細胞内局在を解析した。MuNoVのRNA複製中間体にはN-terminal protein, VPg, RNA polymeraseの他に構造タンパク質と考えられていたVP2が含まれていた。HuNoVと全く同様のMuNoVのリバースジェネティックシステムを構築することができた。MuNoVのリバースジェネティックシステムは、感受性細胞であるマウスRAW264.7細胞は勿論、ヒト細胞株HEK293Tを用いてmuNoVの感染性粒子を作出することが可能であった。

さらに、樹立したRGSが、HuNoV, MuNoVだけでなく、カリシウイルスに対するユニバーサルなシステムとなり得るか否かを検証するため、FCVのゲノム全長をクローニングし、pKS-FCV-Fを作製、同様の検討を行った。pKS-FCV-Fは感受性細胞へのトランスフェクションによって10⁸TCID₅₀/mL以上の感染性ウイルス粒子を産生した。非感受性細胞HEK293Tへのトランスフェクションでは、48時間後に10¹⁻²TCID₅₀/mLのウイルスを産生したが、ウイルス産生量はMuNoVの1/10-1/100程度であつ

た。電子顕微鏡観察で HEK293T から産生されたウイルス粒子が確認された。このウイルス粒子は、中和抗体で中和可能であった。

1-2. MuNoV の増殖馴化に伴う遺伝子配列変化の解析

MuNoV が培養細胞で増殖馴化する過程を解析した。MuNoV S7 株を RAW264.7 細胞で 2 代、3 代、13 代継代し、ウイルス遺伝子の配列変化を詳細に調べた所、増殖馴化の過程では、元々あった遺伝子配列プールの中から特定の配列へ収束することが観察された。この遺伝子変化には細胞内増殖に適したゲノム配列が選択と、特定の配列の adaptive mutation が関与していることが示唆された。RAW264.7 細胞への馴化配列の中で MuNoV 6158 位のチミン(T)をシトシン(C)に変異させた組換え MuNoV を RAW264.7 細胞に感染させ、増殖したウイルスの配列をみると同位がチミン(T)に戻ったもののみ検出された。他の変異ではこの様なリバータントはみられなかったため、MuNoV nt6158 の C から T への変異 (Vp1 aa301 T から I へ)は RAW264.7 細胞での MuNoV S7 株の増殖に必須であることが示唆された。

1-3. 細胞培養によるノロウイルス分離：

CaCo-2、PANC-1、Coα-1 細胞に HuNoV 検体を接種し経時的観察を行った。本年度は、消化系酵素によるウイルスの感染性向上の可能性を考えトリプシン、ペプシン処理を試みた。しかし、ウイルス増殖の目安となる細胞変性効果はいずれの実験条件下でも見られなかった。培養上清中および細胞内の HuNoV 遺伝子量を測定したが、継代培養において遺伝子レベルは減少の一途であった。Coα-1 細胞への GII.4 検体の接種例において、封入体様の構造が蛍光抗体法で観察された。この細胞系は培養、観察を継続中である。

1-4. HuNoV 混合感染の解析：

2年間に亘って HuNoV に 5 回感染した症例を使って混合感染の解析を行った。合計 186869 断片、約 4.75×10^7 塩基の配列情報を取得した。配列情報を詳細に解析した結果、1年以内に、頻回に、

GII.2_GII.15、GII.4 2006b 亜株に感染していたことが明らかとなった。臨床症状は、一回目感染時は、発熱、嘔吐、下痢の典型的急性胃腸炎症状を呈したが、二回目以降、症状は軽減傾向であった。しばしば異なる遺伝子型のノロウイルスが混合感染していることがわかった (3/5 症例)。明らかなキメラウイルスは検出できなかった。

2. ロタウイルス

2-1. ノトバイオートプタを用いた B 群 RoV 感染実験：

B-93-I5 および PB-107-G16 株接種群ともに、全ての個体で水様性下痢が認められ、特に 107-G16 株接種群では極度に衰弱する個体も認められた。いずれの株接種群ともに、接種後 1 日より、特に空腸で絨毛萎縮が認められた。107-G16 株接種群では絨毛萎縮に加えて、粘膜上皮細胞の壊死・脱落や合胞体形成といった特異的な病変が十二指腸から空腸にかけて進行的に観察された。一方、93-I5 接種群では接種後 2 日からすでに萎縮した絨毛の回復が観察された。

電子顕微鏡的検査において、107-G16 株接種群では接種後 1 日の十二指腸および空腸で、93-I5 株接種群では接種後 2 日の空腸でそれぞれウイルス粒子が観察され、それらは特に合胞体内部、絨毛の先端部及び頸部に存在していた。

3. ポリオーマウイルス

3-1. 新規ポリオーマウイルスの中和抗体検出法の開発：

WUPyV、KIPyV の psudovirion を大量に作製・精製した。pCMV-Gluc2 をパッケージする WUPyV、KIPyV psudovirion を、それぞれ 15cm ディッシュ 10 枚分の 293T 細胞から作成し、2 回の 27-39% Optiprep 密度勾配遠沈によって分画精製し、そして psudovirion を含むフラクションを Amicon Ultra 15 (MWC0 100kDa, Millipore) で濃縮した。Vero 細胞あたり 1,000 コピー DNA にあたる WUPyV、KIPyV psudovirion

を導入し、同時にヒト血清 (Sigma-Aldrich, H4522) あるいはウサギ血清の希釈系列を加え、48-60 時間後に細胞上清の Gluc の活性を測定した。この結果、WUPyV、KIPyV 共にヒト血清添加区で 1/40 希釈で Gluc の活性の低下が観察され、ヒト血清による感染阻害と考えられる効果がみられた。一方ウサギ血清では、同様の阻害効果はみられなかった。

3-2. 糖脂質糖鎖を介したヒトポリオーマウイルス感染様式の解析 :

BKV、JCV、MCV の各カプシド蛋白 VP1 をバキュロウイルスで発現させポリオーマウイルス様粒子 (BKV-LP、JCV-LP、MCV-LP) を作製、精製しシアル酸を含む糖脂質であるガングリオシドとの結合解析を行った。その結果、BKV-LP と JCV-LP は 2 残基以上のシアル酸を有する GD1a、GD1b、GD2、GD3、GT1a、GT1b、GQ1b と高親和性を示すなど、よく似た性質を有することが示されたが、シアル酸を 1 残基しか持たない GM1、GM2 は JCV-LP のみと結合した。一方、MCV-LP はこれらと異なり、一連の糖脂質のうち GM3、GD3 のみとの結合が認められた。メルケル細胞癌組織では、ガングリオシドのうち、GM3、GD3 を高発現するとの報告があり、MCV 感染の組織特異性を規定する要因となる可能性が考えられる。

さらに、SV40 をベースにしてポリオーマウイルスカプシド蛋白を交換できる pseudovirion を利用して MCV の感染モデルの作出を試みた。作製した MCV VP1 を持つ pseudovirion は、マウスメラノーマ細胞 MEB4 に対して感染性を示し、そのガングリオシド欠損変異株 GM95 には感染しなかった。一方、GM95 細胞にあらかじめ GD3 を添加しておいた場合、MCV pseudovirion は感染性を示すことが見出された。

4. E 型肝炎ウイルス

4-1. HEV レプリコンの構築 :

HEV 感染性クローンの構造蛋白遺伝子 (ORF2 領域) をレポーター遺伝子と置き換えることにより HEV レプリコンを構築した。しかしながら、レポーター遺伝子の上流に HCV IRES を挿入しな

かった場合、また、HCV IRES を持つ場合にも Luciferase をレポーターとした場合には複製活性を認めなかった。サイズが小さい SecNanoLuc (分泌型の Luciferase) をレポーターとして導入した場合にはレプリコンは機能した。

HEV 構造蛋白を発現する細胞に、IRES-GFPNeo を持つレプリコンを導入した細胞を作製した。その中には構造蛋白の分泌が比較的良好なクローンがあった。これらの細胞クローンの培養上清を濃縮しショ糖遠心密度勾配で分析したところ、構造蛋白は一定の密度に収束し、粒子構造をとっている可能性が示唆された。上記のフラクションを RNase A 処理後に RNA を抽出し、構造、非構造蛋白それぞれの領域の RT-PCR を行ったところ、本フラクションの RNA は RNase A 抵抗性であり、構造領域のみが PCR で増幅されたことから、レプリコンが包埋された粒子である可能性が示唆された。

4-2. ラット HEV の粒子形成解析

組換えバキュロウイルス発現システムを用いてラット HEV の構造蛋白を発現し、VLPs の作製に成功した。N 末端から 12 個のアミノ酸を欠失し発現させることによってバキュロウイルス感染細胞内から直径約 23nm の中空粒子と 35nm の非中空粒子を得た。35nm の粒子はネイティブな HEV と形態が類似し、粒子内にはウイルス RNA が取り込まれていた。また、N 末端から 100 個のアミノ酸を欠失させた上に、C 末端から 593 番目まで 52 個のアミノ酸を欠損させても粒子の形成には影響を与えなかったが、これ以上欠失させると粒子は形成されなくなった。したがって、粒子形成には C 末端は 593 番目のアミノ酸まで必要であることが明らかとなった。

5. ヒトパピローマウイルス

ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染に起因する子宮頸癌の特異的治療薬の分子基盤の構築を目指し、HPV16E6/E6AP による癌抑制遺伝子 p53 の不活化を抑制する小分子の開発および

E6 のユビキチン化機構の解析を行った。RaPID system により、E6AP HECT domain と結合する環状 N-メチルペプチドを 8 種類得た。その中から、環状 N-メチルペプチド CM₁₁-1 および CM₁₁-1S が E6AP のユビキチンリガーゼ活性を強く抑制することを明らかにした。また、E6 のユビキチン化機構の解析から、in vitro において E6AP が HPV11 および HPV16 の E6 のユビキチン化させることを示した。

D. 考察

1. ノロウイルス

片山らが開発した pKS ベクターによるノロウイルス、カリシウイルスの RGS は、非感受性細胞から感染性粒子を作出することが可能であることが明らかとなった。このシステムは、ウイルス表面のレセプター結合部位を入れ替えたキメラウイルス作製、ディフェクティブなワンステップ感染性粒子作製 HuNoV, MuNov, FCV とのキメラウイルスの作製など、新たな遺伝子操作による感染性粒子構築を可能とするとともに、GFP, VENUS などの蛍光レポーターを組み込み、細胞の挙動観察を行うなど、多面的な応用が可能である。HuNoV の推定上のレセプター結合部位を MuNoV のレセプター結合部位と入れ替えた感染性粒子を作出することによって、マウス感染モデルを樹立することが可能になるものと期待される。

HuNoV はヒトの小腸で増殖する。つまり、ヒト小腸細胞に HuNoV に対する受容体が存在していると考えられる。従って、ウイルス分離に用いる培養細胞としてはヒトの腸管由来細胞が適当と考えられる。しかし、これまで CaCo-2 等のヒト腸管由来細胞を用いた HuNoV 分離の試みは不成功であった。細胞への HuNoV 吸着にはヒト血液型物質が大きな役割を果たしているという数多くの報告がある。また、分泌型物質陽性の場合、HuNoV に感染しやすいという報告もある。細胞への HuNoV 吸着に関する詳細な分子生物学的解析と各細胞株についての血液型物質発現、分泌性などの解析が必要と思われる。

HuNoV 混合感染の実態を解明するため、次世

代シーケンサーを用いて網羅的にウイルス遺伝子解析を行い、感染者には、しばしば異なる遺伝子型の HuNoV が混合感染していること、不顕性感染時にも混合感染が認められることがわかった。今後、カプシド蛋白質から成る HuNoV-LP を用いて、様々な遺伝子型の VLP に対する糞便試料中の IgA 抗体を測定することにより、混合感染下において免疫系によってウイルスが淘汰される実態がより明らかになるものと期待される。

MuNoV S7 型の RAW264.7 細胞への増殖馴化の過程で、ゲノム遺伝子配列の変化がみられ、その変化は元々あった遺伝子配列プールの中から特定の配列への収束を伴うものであると考えられた。今後は、次世代シーケンサーなどの利用によって RAW264.7 細胞継代に伴うより詳細な遺伝子プールの変化を解析することにより、MuNoV の細胞馴化の過程の全容を明らかにすることが必要である。これらの知見は HuNoV の細胞培養系開発への糸口となることが期待される。

2. ロタウイルス

乳幼児下痢症の原因である RoV は、A 群以外は培養系が確立されていない。遺伝学的性状や病原性等に関してほとんど未解明なブタ B 群 RoV について、ノトバイオートブタによる感染実験を行い、用いた B 群 RoV 2 株は遺伝学および抗原学的相違に加えて、病原性においても顕著な相違を示すことが明らかとなった。小腸組織内における B 群 RoV の分布と病理組織学的特徴が明らかとなった。また、ノトバイオート豚は本ウイルスの病原性を探究する上で好適なモデル動物であることが示された。

3. ポリオーマウイルス

WUPyV, KIPyV pseudovirion を使用して Vero 細胞への pCMV-Gluc2 導入の際、ヒト血清存在下で感染 (遺伝子導入) 阻害効果を観察することができた。ヒト血清中の中和抗体価を図ることによって WUPyV, KIPyV の感染病理に関してより詳細な検討を加えることが可能になった。

psuodovirion 作製系の改良などでより鋭敏な中和抗体検定系の確立が可能になるものと思われる。

4. E 型肝炎ウイルス

HEV のレプリコンの構築に成功した。また、PLC/PRF/5 細胞に構造遺伝子発現プラスミドとレプリコン RNA を導入することにより、レプリコンを包埋した粒子を取得できる可能性が示唆された。本レプリコンやレプリコンを包埋した粒子は、HEV の感染、増殖過程の解析や阻害剤のスクリーニングに有用であると考えられる。

先進国においても、E 型肝炎はすでに土着していて、人畜共通感染症として注目されている。最近、ウサギ、イノシシ、ラットから新しい遺伝子型の HEV は続々発見されていたが、これらのウイルスが増殖できる培養細胞系は確立されておらず、ウイルス増殖、複製機序および抗原性、病原性は未だに明らかではない。本研究では、組み換えバキュロウイルスを利用してラット HEV の粒子形成解析を行った。N 末端から 12 個のアミノ酸を欠失した rat HEV ORF2 の発現によってネイティブな HEV と類似する直径を持つ粒子の作製に成功した。ウイルス様粒子形成には ORF2 C 末端 593 番目アミノ酸まで必須であることが明らかになった。これらの結果は rat HEV 粒子の三次構造解析に有用である。また、大きな粒子内部には HEV 特異配列を持つ核酸が取り込まれていたことから、rat HEV のパッケージングに関する情報が得られることが期待される。

5. ヒトパピローマウイルス

HPV に持続感染している患者に対する特異的な抗ウイルス薬は未だ存在しない。RaPID system で環状 N-メチルペプチドを作製する技術は E3 リガーゼ阻害剤を作製するのに強力な技術となることが初めて示された。HPV 11E6, 16E6 のユビキチン化反応が E6AP により促進されることが示された。近年、16E6 の脱ユビキチン化酵素として USP15 が同定されたが、今回樹立した *in vitro* ユビキチン化系と精製 USP15 を用いることで、USP15 の活性測定、阻害剤探

索に応用可能であると考えられた。

E. 結論

培養細胞での感染増殖系が確立されていない病原ウイルス群について、ウイルス様粒子、シュードビリオン、近縁動物ウイルスモデルなど種々の新規技術、実験ツールを開発、取得した。今後、これらを駆使して、ウイルス生活環、病態発現の分子機構解析、血清疫学的解析、更に、診断・予防・治療法の開発研究の進展が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Suzuki T. Morphogenesis of infectious hepatitis C virus particles. *Front. Microbiol.* 3: 38 (2012).
2. Ando T., Imamura H., Suzuki R., Aizaki H., Watanabe T., Wakita T, and Suzuki T. Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA. *PLoS Pathog.* 8: e1002561 (2012).
3. Suzuki R., Saito K., Kato T., Shirakura M., Akazawa D., Ishii K., Aizaki H., Kanegae Y., Matsuura Y., Saito I., Wakita T., and Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology*, 432: 29-38 (2012).
4. Fukazawa H, Suzuki T, Wakita T, Murakami Y. A cell-based, microplate colorimetric screen identifies 7,8-benzoflavone and green tea gallate catechins as inhibitors of the hepatitis C virus. *Biol Pharm Bull.* 35: 1320-1327 (2012).
5. Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H,

- Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, Wakita T. Replication of Hepatitis C Virus Genotype 3a in Cultured Cells. *Gastroenterology* 144: 56-58 (2013).
6. Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle. *Microbes Infect.* 15: 45-55 (2013).
 7. Hansman, G. S., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C. A., Kwong, P. D. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. *Journal of virology* vol. 86, 284-92, 2012..
 8. Grant S. Hansman, David W. Taylor, Jason S. McLellan, Thomas J. Smith, Ivelin Georgiev, Jeremy R. H. Tame, Sam-Yong Park, Makoto Yamazaki, Fumio Gondaira, Motohiro Miki, Kazuhiko Katayama, Kazuyoshi Murata, and Peter D. Kwong. Structural Basis for Broad Detection of Genogroup II Noroviruses by a Monoclonal Antibody That Binds to a Site Occluded in the Viral Particle *Journal of virology* vol. 86, 3635-3646, 2012.
 9. Seiya Harada, Tomoichiro Oka , Eisuke Tokuoka, Naoko Kiyota, Koichi Nishimura, Yasushi Shimada, Takehiko Ueno, Shigeru Ikezawa, Takaji Wakita, Qihong Wang, Linda J. Saif, and Kazuhiko Katayama. A confirmation of sapovirus re-infection gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002-2011. *Arch Virol* DOI 10.1007/s00705-012-1387-7, 2012 online.
 10. Matsuhira, T., Kaji, C., Murakami, S., Maebashi, K., Oka, T., Takeda, N. and Katayama, K. Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus. *Exp Anim.* vol. 61, 35-40, 2012.
 11. Oka, T., Mori, K., Iritani, N., Harada, S., Ueki, Y., Iizuka, S., Mise, K., Murakami, K., Wakita, T., and Katayama, K. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Arch Virol.*, vol157, 349-52, 2012.
 12. Tyler M Sharp, Sue E Crawford, Nadim J Ajami, Frederick Neill, Robert L Atmar, Kazuhiko Katayama, Budi Utama, Mary K Estes. Secretory pathway antagonism by calicivirus homologues of Norwalk virus nonstructural protein p22 is restricted to noroviruses. *Virology Journal* 2012, 9:181 (3 September 2012)
 13. Yoshiki Fujii, Takashi Shimoike, Hirotaka Takagi, Kosuke Murakami, Reiko Todaka-Takai, YoungBin Park and Kazuhiko Katayama. Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction . *Microbiol Immunol.* 56: 630-638, 2012.
 14. Masaru Yokoyama, Tomoichiro Oka, Hirotatsu Kojima, Tetsuo Nagano, Takayoshi Okabe, Kazuhiko Katayama, Takaji Wakita, Tadahito Kanda and Hironori Sato. Structural basis for specific recognition of substrates by sapovirus protease. *Frontiers in Microbiology* 3: Article 312, 1-10, 2012
 15. Motohiro Miki and Kazuhiko Katayama. In silico 3D structure analysis accelerates the solution of a real viral structure and antibodies docking mechanism. *Frontiers in Microbiology* 3: Article 387, 1-6, 2012

16. Kitamoto N, Oka T, Katayama K, Li TC, Takeda N, Kato Y, Miyoshi T, Tanaka T. Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. *Microbiol Immunol.* 56(11):760-770, 2012.
17. 田中智之. 三好龍也、内野清子、吉田永祥. 感染症迅速診断キットの有用性と限界-ノロウイルス- 小児科 53(4), 437-442, 2012
18. 田中智之、小林尚明、豊田 茂、佐藤雅久、佐野康子、竹田弘、柏井健作、家永信彦、中田修二、宇加江進、佐藤 勇、原錬太郎、中野 徳、田中敏博、五十嵐隆夫、水澤一郎、田尻 仁. ノロウイルス抗原迅速診断試薬クイックナビ™ -ノロ2の評価. 医学と新薬 68(6), 1033-1039, 2012
19. 本村和嗣, 横山勝, 岡智一郎, 片山和彦, 野田衛, 田中智之, 佐藤裕徳, Norovirus Surveillance Group of Japan. ノロウイルスのゲノム解析と流行発生のしくみ. 感染症学雑誌: 86: 563-568, 2012
20. 田中智之. 新規に保険収載された検査法 ノロウイルス抗原迅速定性検査. モダンメディア: 58(11); 337-341, 2012
21. 佐藤裕徳、横山勝、本村和嗣 “ヒトノロウイルス流行の基礎知識と検査法” 日本臨床 Vol.70(8) p.1272- 1276 : 2012年 8月号 ; 日本臨床社
22. Motomura K., YOKOYAMA M., , OKA T., , KATAYAMA K., , NODA M., , TANAKA T., SATO H. “A Mechanism of Norovirus Pandemic Based on Comprehensive Genome Analysis” *Jpn. J. Infectious Disease.* 2012 Sep;86 (5):563-568.
23. 本村和嗣、大石和徳 “ノロウイルス感染症” からだの科学 2012年 12月号 日本評論社
24. Watanabe M, Phamduong E, Huang C-H, Itoh N, Bernal J, Nakanishi A, Rundell K, Gjoerup O, and Kasamatsu H. Formation of covalently modified folding intermediates of simian virus 40 Vp1 in large T antigen-expressing cells. *Journal of Virology* (in press)
25. Soma J, Tsunamitsu H, Miyamoto T, Suzuki G, Sasaki T, Suzuki T. Whole-genome analysis of two bovine rotavirus C strains: Shintoku and Toyama. *J Gen Virol*, 94; 128-135, (2013).
26. Suzuki T, Soma J, Miyazaki A, Tsunemitsu H. Phylogenetic analysis of nonstructural protein 5 (NSP5) gene sequences in porcine rotavirus B strains. *Infect, Genet, Evol*, 12: 1661-1668 (2012).
27. Marthaler D, Rossow K, Gramer M, Collins J, Goyal S, Tsunemitsu H, K Kuga, Suzuki T, Ciarlet M, Matthijnsens J. Detection of substantial porcine group B rotavirus genetic diversity in the United States, resulting in a modified classification proposal for G genotypes. *Virology*, 433: 85-96 (2012).
28. Fukuda M, Kuga K, Miyazaki A, Suzuki T, Tasei K, Aita T, Mase M, Sugiyama M, Tsunemitsu H. Development and application of one-step multiplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of five diarrheal viruses in adult cattle. *Arch Virol* 157; 1063-1069 (2012).
29. Kanda T., Wu S., Kiyohara T., Nakamoto S., Jiang X., Miyamura T., Imazeki F., Ishii K., Wakita T. and Yokosuka O. Interleukin 29 suppresses hepatitis A and C viral internal ribosomal entry site-mediated translation. *Viral Immunology*, 25: 379-386 (2012)
30. Kubota T., Kumagai A., Ito H., Furukawa S., Ishii K., Wakita T., Takeda N., Someya Y., Narimatsu H. and Shirato H. Structural basis for the recognition of Lewis antigens by genogroup I norovirus.

- Journal of Virology, 86: 11138-11150 (2012)
31. Tominaga A., Kanda T., Akiie T., Komoda H., Ito K., Abe A., Aruga A., Kaneda S., Saito M., Kiyohara T., Wakita T., Ishii K., Yokosuka O. and Sugiura N. Hepatitis A outbreak associated with a revolving sushi bar in Chiba, Japan: application of molecular epidemiology. *Hepatology Research*, 42: 828-834 (2012)
 32. Miyamura T., Ishii K., Kanda T., Tawada A., Sekimoto T., Wu S., Nakamoto S., Arai M., Fujiwara K., Imazeki F., Kiyohara T., Wakita T. and Yokosuka O. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. *Hepatology Research*, 42: 248-253 (2012)
 33. Ishii K., Li T.C., Yoshizaki S., Shiota T., Kato T., Takeda N. and Wakita T. Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. *Hepatology International*. 6: 292 (2012)
 34. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Wakita T., Shimada T., Nakamura N., Nakashima K., Tada Y. and Noda M. Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Journal of Clinical Virology*, 53, 219-224 (2012)
 35. 石井孝司、清原知子 A型肝炎ワクチン *BIO Clinica* 28: 25-29 (2013)
 36. 石井孝司、脇田隆字 海外におけるA型肝炎集団発生 -わが国への警鐘- 化学療法の領域 28: 984-992 (2012)
 37. 石井孝司 2010年春季のA型肝炎のdiffuse outbreakの分子疫学的解析 *消化器内科* 54: 233-238 (2012)
 38. Li TC, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Yasuda SP, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takeda N, Wakita T. Susceptibility of laboratory rats against genotypes 1, 3, 4, and rat hepatitis E viruses. *Vet Microbiol.* 2013, 163:54-61.
 39. Tian-Cheng Li, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Shumpei P. Yasuda, Kumiko Yoshimatsu, Jiro Arikawa, Naokazu Takeda, and Wakita Takaji. Full-Genome Characterization of a Rat Hepatitis E Virus Strain Isolated in Vietnam. *EID*. 2013 Jan;19(1):115-8.
 40. Pitchanee Jariyapong, Li Xing, Nienke E. van Houten, Tian-Cheng Li, Wattana Weerachathanukul, Benjamin Hsieha, Carlos G. Moscoso, Chun-Chieh Chen, Masahiro Niikura, R. Holland Cheng, Chimeric hepatitis E virus-like particle as a carrier for oral-delivery. *Vaccine*. 2013, 31:417-424
 41. Hiroshi Yamamoto, Juri Suzuki, Atsushi Matsuda, Takafumi Ishida, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Adachi Isao, Takaji Wakita, Naokazu Takeda, and Tian-Cheng Li Hepatitis E Outbreak in Monkey Facility, Japan. *EID* 18 (12) 2032-2034 (2012).
 42. Koma T, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Li TC, Amada T, Shimizu K, Isozumi R, Mai LT, Hoa NT, Nguyen V, Yamashiro T, Hasebe F, Arikawa J. A survey of rodent-borne pathogens carried by wild Rattus spp. in Northern Vietnam. *Epidemiology and Infection*. *Epidemiol Infect.* 2012 Nov 1:1-9.
 43. Tian-Cheng Li, Susumu Ochiai, Hiroaki Ishiko, Takaji Wakita, Tatsuo Miyamura and Naokazu Takeda. A retrospective study on imported hepatitis E in Japan. *Travel Med Infect Dis.* 2012;10(2):80-5.
 44. Ichimura, T., Taoka, M., Shoji, I., Kato, H., Hatakeyama, S., Isobe, T., and Hachiya, N. 14-3-3 Proteins sequester a

- pool of soluble TRIM32 ubiquitin ligase to repress autoubiquitination and cytoplasmic body formation., *Journal of Cell Science*, in press.
45. Matsui, C., Shoji, I., Kaneda, S., Sianipar, IR., Deng, L., and Hotta, H. Hepatitis C virus infection suppresses GLUT2 gene expression via down-regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α . *J Virol*, 2012, 86 (23): 12903-11.
46. Shoji, I. Roles of the two distinct proteasome pathways in hepatitis C virus infection. *World J Virol*, 2012, 1, 44-50.
47. El-Shamy, A., Shoji, I., El-Akel, W., Bilasy SE, Deng, L., El-Raziky, M., Jiang, D., Esmat, G., and Hotta, H. NS5A sequence heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4a predicts clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy in Egyptian patients. *J Clinical Microbiology*, 2012, 50 (12): 3886-92.
48. Nakashima, K., Takeuchi, K., Chihara, K., Deng, L., Shoji, I., Hotta, H., and Sada, K. HCV NS5A protein containing potential ligands for both Src homology 2 and 3 domains enhances autophosphorylation of Src family kinases Fyn in B cells. *PLoS One*, 2012, 7 (10):e46634.
49. Kim, S-R., El-Shamy, A., Imoto, S., Kim, KI., Ide, Y-H., Deng, L., Shoji, I., Tanaka, Y., Hasegawa, Y., Ota, Mitsuhiro., and Hotta, H. Prediction of response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C genotype 1b and high viral load. *Journal of Gastroenterology*, 2012, 47 (10): 1143-51.
50. El-Shamy, A., Shoji, I., Kim S-R., Ide, Y-H., Imoto, S., Deng, L., Yoon, S., Fujisawa, T., Tani, S., Yano, Y., Seo, Y., Azuma, T., and Hotta, H. Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated-Interferon/Ribavirin therapy. *PLoS One*, 2012, 7, e30513, 1-10.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

Ⅱ. 分担研究報告書

ノロウイルスの複製機構

分担研究者	片山 和彦	国立感染症研究所	ウイルス第二部第一室	室長
研究協力者	下池 貴志	国立感染症研究所	ウイルス第二部	主任研究官
研究協力者	村上 耕介	国立感染症研究所	ウイルス第二部第一室	研究員
研究協力者	戸高 玲子	国立感染症研究所	ウイルス第二部第一室	非常勤職員

研究要旨 ヒトノロウイルス (HuNoV) の複製機構研究のため、昨年度に引き続き、近縁のマウスノロウイルス (MuNoV) のタンパク質、virus RNA の細胞内局在を解析した。MuNoV の RNA 複製中間体には N-terminal protein, VPg, RNA polymerase の他に構造タンパク質と考えられていた VP2 が含まれていた。HuNoV と全く同様の MuNoV ののリバーシジェネティクスシステムを構築した。MuNoV のリバーシジェネティクスシステムは、感受性細胞であるマウス RAW264.7 細胞は勿論、ヒト細胞株 HEK293T を用いて muNoV の感染性粒子を作出することが可能であった。

A. 研究目的

本研究は、培養細胞で増殖させることのできないヒトノロウイルス (HuNoV) を研究対象とし、培養細胞を用いた効率の良い HuNoV 増殖システム構築を行うことを目的としている。我々の構築した HuNoV のリバーシジェネティクスシステムは、プラスミドに組み込んだ HuNoV の cDNA をほ乳類細胞に導入し、HuNoV ウイルスゲノムが内包されたウイルス粒子を産出することが可能である。しかし、電子顕微鏡で粒子を確認するには、225cm² の培養フラスコ 20 枚ほどのスケールを必要とする。HuNoV は、通常、感染者の糞便中に 10⁵⁻⁹ 乗/g 程度の濃度で含まれており、自然宿主であるヒト体内では、非常に効率よく増殖していると考えられる。

初年度は、HuNoV がどのように細胞内で増殖し、自然な増殖がリバーシジェネティクスシステムとどのように異なるのかを調べるため、培養細胞で増殖させることが可能な、マウスノロウイルス (MuNoV) の細胞内動態を調べた。2

年目は、MuNoV のタンパク質合成、RNA 合成の細胞内局在の経時的変化を追跡し、自然な MuNoV 感染増殖と HuNoV のリバーシジェネティクスシステムとの比較検討を行った。最終年度は、MuNoV やネコカリシウイルス (FCV) のリバーシジェネティクスシステム (RGS) を構築し、自然な感染増殖との比較検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. 材料

2002 年に東京大学大学院農学生命研究科の遠矢幸伸准教授によってマウスより分離された MuNoV-S7 株をウイルスとして用いた。マウス RAW264.7 細胞、ヒト HEK293T 細胞は、ATCC より購入した。MuNoV S7 株の各種タンパク質、Nterminal protein, NTPase, VPg, RNA dependent RNA polymerase (RdRp), VP1, VP2 は、それぞれ標的領域を大腸菌で発現させ、精製後にウサギとモルモットに免疫して抗 MuNoV

血清を作製した (α Nterm, α NTPase, α VPg, α RdRp, α VP1, α VP2 と表記する。)複製中間体である MuNoV2 本鎖 RNA の検出には、抗 2 本鎖 RNA 抗体 (α dRNA MoAb) を用いた。

2. MuNoV 蛋白質検出の検出

MOI 0.01 で RAW264.7 細胞に MuNoV-S7 株を感染させ、12 時間後に固定、もしくは以後の処理を行う事で、観察に用いた。MuNoV 蛋白質とゲノム複製中間体である二本鎖 RNA の観察には、冷メタノール固定した細胞を用いた。また、MuNoV のゲノム RNA 合成を観察するためには、アクチノマイシン D 処理を行い、細胞の RNA 合成を止めた後、BrU を細胞にトランスフェクションし、MuNoV ゲノム RNA より RdRp にてトランスクリプションされる一本鎖 RNA に BrU を取り込ませた。その後、細胞を冷メタノール固定し、抗 BrU 抗体を用いた免疫染色を行った。

細胞の免疫染色は、一次抗体に標的物特異的抗血清、もしくはモノクローナル抗体を用い、二次抗体に一次抗体を認識する蛍光物質ラベル抗体を用いた。

免疫染色した細胞の観察は、蛍光顕微鏡を用いて行い、標的蛋白質、核酸の細胞内局在の解析にはオリンパス社の DSU ユニット IX-80 デコンボリューションシステムと、ツァイス社の共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

3. MuNoV、FCV リバースジェネティックス

HuNoV pKS-U201F (RGS に用いるプラスミドコンストラクト)を骨格として、HuNoV U201 genome 部分を MuNoV genome cDNA, FCV genome cDNA に InFusion cloning system を用いて置き換え、pKS-MuNoVF, pKS-FCV-F を構築した。それぞれの感受性細胞 (MuNoV は RAW264.7 細胞、FCV は CRFK 細胞) を 6 well ディッシュに 70%コンフルエントになるように培養し、4ug の pKS-MuNoVF または pKS-FCV-F をトランスフェクションした。上清を回収し、TCID50 を測定することで、上清に含まれる感染性ウイルス粒子量を定量した。

HEK293T 細胞は、6 well ディッシュに 70%コンフルエントになるように培養し、4ug の

pKS-MuNoVF または pKS-FCV-F をトランスフェクションした。上清に含まれる感染性ウイルス粒子量は TCID50 を測定することで定量した。

電子顕微鏡観察に用いた新生ウイルス粒子は、T75 フラスコ 10 本分の HEK293T 細胞を用いて、調整した。トランスフェクション後 48 時間の培養上清を回収し、10000g にて 20min の遠心操作で得られた上清から、以下の操作で精製した。

上記操作で得られた上清を、SW32Ti ローターにより 31000rpm, 3 時間の遠心を行い、ペレット得た後、ペレットを CsCl 浮上密度勾配遠心にかけて、密度 1.36-40g/cm³ のフラクションを回収することで精製した。

4. 電子顕微鏡観察

感染性粒子は、前述の操作で回収したフラクション全量を DW で 10 倍に希釈し、SW55Ti ローターにて 3600rpm, 3 時間の遠心を行ってペレットとして回収した。その後、50ul の DW に再懸濁し、電子顕微鏡観察に用いた。電子顕微鏡観察は、国立感染症研究所感染病理部に依頼し、酢酸ウラン染色を用いたネガティブ染色で行った。

C. 研究結果

マウスノロウイルスは、感染後 6 時間ほどで、細胞内に非構造タンパク質が発現し、その後、構造タンパク質の発現が認められる。また、ウイルスの増殖を培養上清のリアルタイム RT-PCR でモニターしたところ、感染後 6 時間からウイルス RNA タイターが上昇し、48 時間後まで上昇が続くことから、ウイルスの増殖サイクルが 6~8 時間であることを昨年明らかにした。本年度は、感染後 13 時間で感染細胞を固定し、免疫染色に用い RNA 複製複合体を観察した。Nterm, NTPase, VPg, RdRp とウイルス RNA 複製中間体である double stranded RNA は、細胞の各周辺部に大きなドット上の構造物を形成し、複製複合体として存在していた。興味深い事に、構造タンパク質 VP2 も共局在していた。ウイルス粒子にパッケージングされる一本鎖ゲノム RNA は、粒子を構成する構造タンパク

質 VP1 と細胞周辺部で、共局在していた。VPg、VP2 は、細胞周辺部では検出できなかった。

MuNoV の自然な感染動態と RGS による MuNoV タンパク質の細胞内動態を比較検討し、HuNoV の RGS にフィードバックするため、MuNoV の RGS 用プラスミド pKS-MuNoV-F を構築し RGS の検証を行った。MuNoV 感受性細胞である RAW264.7 に pKS-MuNoV-F をトランスフェクションし、48 時間後に上清を回収して感染性ウイルス産生の有無を確認したところ、 10^6 TCID₅₀/mL の感染性ウイルス粒子濃度を示した。

HuNoV の RGS では、トランスフェクション後 6 時間でアクチノマイシン D を加えることでプラスミドからの RNA 供給を完全に停止させ、HuNoV の自然感染を模倣すると、非制御状態の約 60 倍の新生ウイルス粒子産生効率の向上が認められた。そこで、感染性ウイルス粒子産生効率の向上を目指し、MuNoV の RGS でも同様の制御を試みた。RAW 細胞はアクチノマイシン D 処理により致命的なダメージを受け、上清へのウイルス放出が完全に停止することが明らかになった。

HuNoV では、感受性培養細胞がないため、HEK293T 細胞、COS7 細胞などを RGS に用いて、新生粒子産生を行っている。MuNoV においてもこれらの非感受性細胞で新生粒子産生が可能で有り、かつ、それらが感染性を有するかどうかを検討した。HEK293T 細胞に pKS-MuNoV-F をトランスフェクションし、24 時間後、48 時間後、72 時間後に細胞上清を回収して、細胞上清中に含まれる感染性ウイルス粒子量を測定した。24 時間後は 0-10 TCID₅₀/mL、48 時間後、72 時間後では 10^3 ~ 10^4 TCID₅₀/mL の感染性ウイルスが認められた。上清に含まれるウイルスは、MuNoV に対する中和血清で中和可能であった。

トランスフェクション後 48 時間と 72 時間ではウイルス量の差が認められなかったため、48 時間後に上清を回収し、上清中に含まれる感染性ウイルス粒子を電子顕微鏡で確認した。T75 フラスコ 10 枚分の上清から、前述の精製方法に従ってウイルスを精製し、電子顕微鏡で粒子を確認したところ、RAW で増殖させたウイルスと同様の粒子が確認された。これらの感染性粒子

が、HEK293T 細胞に感染できるか否かを、免疫染色を用いて調べた。トランスフェクション後 48 時間の上清を回収し、それを新たな 293T 細胞の感染させた。24 時間後に HEK293T 細胞を固定し、 α Nterm、 α RdRp、 α VP1 でウイルスタンパク質の検出を試みたが、染色された細胞は認められなかった。

ここまでの、結果をまとめると、MuNoV の RGS は、主のバリアを超え、非感受性細胞 HEK293T 細胞で完全な感染性粒子の産生が可能であることが明らかになった。しかし、感染性粒子は、非感受性細胞 HEK293T 細胞には感染できないことが明らかになった。

さらに pKS による RGS が、HuNoV、MuNoV だけでなく、カリシウイルスに対するユニバーサルな RGS となり得るか否かを検証するため、FCV のゲノム全長をクローニングした pKS-FCV-F を用いて、同様の検討を行った。以下、簡潔に結果を示す。pKS-FCV-F は感受性細胞へのトランスフェクションによって 10^8 TCID₅₀/mL 以上の感染性ウイルス粒子を産生した。非感受性細胞 HEK293T へのトランスフェクションでは、48 時間後に 10^{1-2} TCID₅₀/mL のウイルスを産生したが、ウイルス産生量は MuNoV の 1/10-1/100 程度であった。電子顕微鏡観察で HEK293T から産生されたウイルス粒子が確認された。このウイルス粒子は、中和抗体で中和可能であった。

D. 考察

Nterm、NTPase、VPg、RdRp と MuNoV の double stranded RNA が、各周辺部に共局在していた異から、これらが複製複合体であると思われた。VP2 は感染性粒子内部にも含まれていることが報告されており、VP1 の裏打ちをすることで粒子の安定性に寄与していると考えられている。しかし、免疫染色では、VP2 も複製複合体と共局在していた。VP2 は複製複合体上で RNA トランスポーターや、転写制御などに関わっている可能性、酵素としての何らかの活性を有する可能性などが考えられた。

細胞周辺部で一本鎖ゲノム RNA と VP1 の共局

在が認められたが VPg、VP2 は細胞周辺部では検出されなかった。結果は示さないが、免疫沈降ではこれらが VP1 と共沈降することが明らかになった。以上から、細胞周辺に存在する VP2、VPg はすでに何らかの構造、たとえば VP1 との 4 次構造を形成しており、抗体がターゲット領域にアクセスできない状態であるため、検出できなかったのかもしれない。これらを明らかにするためには、タイムコースなどの詳細な検討が必要である。

MuNoV の RGS 用プラスミド pKS-MuNoV-F は、MuNoV 感受性細胞である RAW264.7 のみならず非感受性細胞 HEK293T 細胞でも感染性粒子を産生可能であった。pKS-FCV-F も同様の結果を示したことから、HuNoV の RGS に用いている pKS ベクターは、カリシウイルスのゲノムをユニバーサルにドライブ可能である事が示された。従って、HuNoV の RGS から産生される粒子には感染性がある可能性が強く示唆された。カリシウイルス増殖における種のバリアは、主に細胞への吸着から侵入、脱核までの一連の初期ステップに有り、それ以降のタンパク質合成からゲノム複製、パッケージング、粒子放出のステップには、あまり強い宿主依存性が無いと思われた。

HuNoV の RGS では、アクチノマイシン D でプラスミドからのゲノム供給を制御し、自然感染を模倣すると、非制御状態の約 60 倍の新生ウイルス粒子産生効率の向上が認められる。しかし、MuNoV の場合、感受性細胞の RAW 細胞は、アクチノマイシン D 処理に過敏で有り、調べることができなかった。非感受性細胞の HEK293T を用いたアクチノマイシン D 処理試験では、上清中のウイルス様粒子が 60 倍以上に増加したが、それらの感染性はほとんど無く、ゲノムを持たない中空粒子である事が明らかになった HuNoV の RGS においても、同様の結果を示す可能性がある。

pKS による RGS は、非感受性細胞から感染性粒子を作出することが可能である。このシステムは、ウイルス表面のレセプター結合部位を入れ替えたキメラウイルス作製、ディフェクティブなワンステップ感染性粒子作製 HuNoV, MuNov,

FCV とのキメラウイルスの作製など、新たな遺伝子操作による感染性粒子構築を可能とするとともに、GFP, VENUS などの蛍光レポーターを組み込み、細胞の挙動観察を行うなど、多面的な応用が可能である。

HuNoV の推定上のレセプター結合部位を MuNOV のレセプター結合部位と入れ替えた感染性粒子の作出をこころみ、マウス感染モデル作製にも応用可能と考えられた。

E. 結論

MuNoV の自然な感染モデルと HuNoV の RGS の比較、MuNoV, FCV などの RGS との比較から、これらのウイルスの宿主特異性は、主に細胞への吸着侵入から脱核に至までの初期ステップにある事が示唆された。以上から、構造タンパク質部分をスワップしたキメラウイルスを作製すれば、マウスに感染する HuNoV が構築できる可能性が高い。3 年目の研究において、HuNoV と MuNoV, FCV の RGS の稼働に成功したことで、それぞれの機能タンパク質の性状研究、病原性発現機構の研究の大幅な加速が期待できる。さらに、キメラウイルスを RGS で作製し、それらを用いた HuNoV 感染モデル動物の開発の可能性も見えてきた。

F. 研究発表

英文論文発表のみ記載

1. Hansman, G. S., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C. A., Kwong, P. D. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. *Journal of virology* vol. 86, 284-92, 2012..
2. Grant S. Hansman, David W. Taylor, Jason S. McLellan, Thomas J. Smith, Ivelin Georgiev, Jeremy R. H. Tame, Sam-Yong Park, Makoto Yamazaki, Fumio Gondaira, Motohiro Miki, Kazuhiko